



NUCLEOGEL® SUGAR 810 H ION 300 OA

Bitte beachten: Allen HPLC-Säulen von MACHEREY-NAGEL liegt ein Zertifikat bei, dem spezifische Daten und Testergebnisse der Säule entnommen werden können. Mit der NUCLEOGEL® SUGAR 810 H bzw. der NUCLEOGEL® ION 300 OA Säule haben Sie ein Qualitätsprodukt auf Basis eines Polymers erworben, das besondere Sorgfalt erfordert. Die Aufgabe von organischen Lösemitteln auf die Säule (außer wie später beschrieben) verursacht ein Quellen des Polymers, und daraus resultierend einen Überdruck in der Säule. Deshalb sollte man sich vor dem Einbau der Säule mit dem Inhalt dieser Gebrauchsanleitung vertraut machen. Diese Säulen sind speziell für den Einsatz in der chromatographischen Hochleistungsanalytik entwickelt worden. Bei sorgfältiger und sachgerechter Verwendung können beste Trennergebnisse und eine lange Lebensdauer erzielt werden. Diese Produkte können je nach Modifizierung zur Trennung und zur quantitativen Bestimmung von Zuckern, Zuckeralkoholen, Alkoholen und organischen Säuren eingesetzt werden. Alle HPLC-Trennsäulen sind gemäß den allgemeingültigen Prinzipien und Arbeitstechniken der Hochleistungs-Flüssigchromatographie zu verwenden. Der korrekte Ablauf der Methodik und insbesondere die Prüfung der Leistungsfähigkeit des kompletten Trennsystems, also Trennsäule und Chromatographie-Anlage sowie die Anpassung der Trennbedingungen an die Erfordernisse der jeweiligen Problemstellung liegt in der Verantwortung des Kunden und ist durch den jeweiligen Anwender sicherzustellen. MACHEREY-NAGEL übernimmt keine Garantie oder Gewährleistung für die erfolgreiche Durchführung von Applikationen oder Trennungen. Falls Sie nach dem Lesen dieser Anleitung noch Fragen haben sollten, wenden Sie sich bitte an unseren Service/technische Produktberatung.

Inhaltsübersicht

- Sicherheitshinweise
- Beschreibung der Säulen
- Installation
- Vorsäulen
- Probe
- Eluent
- Flussrate und Druck
- Temperatur
- Detektion
- Equilibrierung
- Säulenaufbewahrung
- Anwendungsbeispiele
- Behebung möglicher Fehler
- Säulenregenerierung
- Zusammenfassung

Sicherheitshinweise

Beachten Sie die allgemeinen Gefahrenhinweise für die jeweiligen Mobilphasensysteme (z. B. verd. Schwefelsäure) und treffen Sie beim Arbeiten entsprechende Schutzmaßnahmen, z. B. Augenschutz gegen austretende Flüssigkeiten bei plötzlichem Bruch von Kapillarverbindungen. Bitte führen Sie verbrauchte HPLC-Säulen gemäß den landesspezifischen Umweltrichtlinien einer fachgerechten Entsorgung zu. Gewährleisten Sie, dass die Trennsäulen nur von dem dafür zuständigen Fachpersonal eingesetzt werden. Lassen Sie HPLC-Säulen nicht in die Hände von Kindern gelangen. Jegliche Garantie oder Gewährleistung von MACHEREY-NAGEL erlischt, falls durch unsachgemäße Verwendung oder Behandlung (insbesondere das Öffnen der Säule und Freilegen des Säulenbettes) Folgeschäden auftreten.

Beschreibung der Säulen

Als stationäre Phase enthalten die Säulen NUCLEOGEL® SUGAR 810 H und NUCLEOGEL® ION 300 OA sulfonierte sphärische Polystyrol/Divinylbenzol-Harze (PS/DVB) in H⁺ Form. Die Polymerphase SUGAR 810 H wurde speziell für die Trennung einer Vielzahl polarer organischer Verbindungen, wie organische Säuren, Alkoholen, Zuckeralkoholen und Zuckern entwickelt; NUCLEOGEL® ION 300 OA ist speziell geeignet für die Trennung von organischen Säuren, Alkoholen und Zuckern aus Wein, Fruchtsaft, weiteren Lebensmitteln und biologische Proben. Die Trennung der Analyten basiert auf einer Kombination verschiedener Mechanismen. Durch die Ladung der Sulfonsäuregruppen spielen Ionenausschluss- und Ionenaustauscheffekte eine Rolle. Hydrophobe Wechselwirkungen und sterischer Ausschluss werden durch das Polystyrolgrundgerüst ermöglicht.

Installation

Der Einbau der HPLC-Säulen sollte unter Berücksichtigung der Flussrichtung, die auf dem Säulenetikett vermerkt ist, erfolgen. Sie werden mit gerätetypischen 1/16" Kapillaren und Verschraubungen angeschlossen, die zur Vermeidung von Totvolumen möglichst kurz sein sollten.

Vorsäulen

Zum Schutz und zur Verlängerung der Lebensdauer der Säulen, insbesondere bei stark matrixbelasteten Proben, sind Vorsäulen empfehlenswert. Die Filterelemente und das Sorbens der Vorsäule halten Verunreinigungen aus der Probe oder dem Eluenten zurück. Der Anschluss der Vorsäule an die Trennsäule erfolgt mittels Vorsäulenhalter (siehe hierzu www.mn-net.com oder MN Chromatographie-Katalog). Ein Wechsel der Vorsäule ist erforderlich, sobald eine Erhöhung des Säulendruckes und/oder eine Verschlechterung der Trennleistung beobachtet wird.

Probe

Die in der Regel wässrige Probe sollte vor der Aufgabe auf die Säule durch einen Spritzenvorsatzfilter (z. B. CHROMAFIL® Xtra PET, 0,45 µm, 25 mm, REF 729220) filtriert werden. Falls trotz Filtration noch trübe Lösungen in die Säule injiziert werden, kann das die Lebensdauer der Säule beträchtlich verkürzen. Vermeiden Sie die Aufgabe von Fetten, Ölen, eierweißartigen Materialien und Partikeln auf die Säule. Diese Substanzen erzeugen auf Dauer einen erhöhten Rückdruck, und sind oft schwierig, oder überhaupt nicht zu entfernen. Darüber hinaus enthalten Proben in der Lebensmittelindustrie oftmals organische Substanzen, die in der Probenlösung löslich sind, nicht aber im Eluenten. Eine Ansammlung dieser Verbindungen kann ein Verstopfen und damit einen Überdruck in der Säule hervorrufen. Nur in wenigen Fällen kann dann eine Regenerierung (siehe Säulenregenerierung) die ursprüngliche Säuleneffizienz wieder herstellen. Verunreinigungen wie Salze und Proteine ändern das Retentionsverhalten der Säule, und müssen deshalb durch eine entsprechende Probenvorbereitung (z. B. Proteinfällung) noch vor der Injektion aus den Proben entfernt werden. In der Literatur sind zahlreiche Methoden für die Probenaufreinigung beschrieben. Auch Probenvorbereitungsmethoden mittels Festphasenextraktion, z. B. mit CHROMABOND® SPE-Säulen, lassen sich zur Entfernung von Störkomponenten und Matrixbestandteilen anwenden.

Das maximale Injektionsvolumen, das auf die Säule gegeben werden kann, sollte für eine spezielle Probe empirisch bestimmt werden. In der Regel bewirken kleinere Probenvolumina höhere Trennleistungen. Je nach Konzentration der Probe können zu große Injektionsvolumen zu Peakverbreiterung oder Überlappung mit benachbarten Peaks führen. Wir empfehlen daher Probenvolumina im Bereich von 10 bis 50 µL.

Eluent

Als Eluent wird verdünnte Schwefelsäure in Konzentrationen von 0,5–25 mmol/L verwendet, der durch eine 0,2–0,45 µm Membran filtriert und vor Gebrauch entgast wurde. Andere verdünnte Säuren wie Phosphorsäure, Perchlorsäure und Salpetersäure können eingesetzt werden; Halogenid-haltige Säuren (z. B. Salzsäure) sind nicht empfehlenswert, da sie den Edelstahl der Säulen angreifen. Bei der SUGAR 810 H kann bis zu 30 Vol.-% Acetonitril als organischer Modifizierer zugesetzt werden. Zur Umstellung auf einen Acetonitril-haltigen Eluenten wird die Säule zuerst mit einer 5%igen Acetonitrilmischung bei einer Flussrate von 0,1 mL/min gespült (mind. 3 h). Dann kann sie mit einem höheren Acetonitrilanteil equilibriert werden. Die Eluenten sollten stets mit entmineralisiertem Wasser und Reagenzien für die Analyse, frei von Metallionen angesetzt werden. Eluenten mit anderen Kationen als H⁺ schädigen die Trennphase.

Flussrate und Druck

Die Flussraten sollten so gewählt werden, dass der resultierende Druck 70 bar (SUGAR 810 H) bzw. 150 bar (ION 300 OA) nicht überschreitet. Typische Flussraten liegen zwischen 0,1 bis maximal 0,7 mL/min. Änderungen der Flussrate sollten schrittweise durchgeführt werden. Wir empfehlen den Rückdruck regelmäßig zu überprüfen. Wenn bei der Benutzung der Säule unter normalen Flussraten ein erhöhter Rückdruck resultiert, deutet dieses im Allgemeinen auf eine Verunreinigung des Packungsmaterials hin, die entfernt werden muss (siehe Behebung möglicher Fehler).

Temperatur

Die optimalen Temperaturen für erfolgreiche Trennungen müssen empirisch ermittelt werden. Der Anwendungsbereich liegt zwischen 20 und 90 °C. Um reproduzierbare Ergebnisse zu erhalten, ist eine Säulenheizung auch bei Raumtemperatur empfehlenswert. Allgemein gilt, dass höhere Säulentemperaturen die Retention der Probe verringern, die Trennleistung verbessern und den Säulendruck reduzieren. Insbesondere bei niedrigen Temperaturen muss die Flussrate so angepasst werden, dass der maximale Druck nicht überschritten wird.

Detektion

Mit den Säulen werden vorrangig refraktometrische Detektoren benutzt. Es können aber auch spektralphotometrische, massenspektrometrische und elektrochemische Detektoren benutzt werden. Bei der Verwendung elektrochemischer Detektoren muss berücksichtigt werden, dass einige Arbeitselektroden keine erhöhten Temperaturen erlauben. Falls eine höhere Empfindlichkeit erforderlich ist, können Nachsäulenderivatierungen mit einem geeigneten Detektor für die Reaktionsprodukte eingesetzt werden.

Equilibrierung

Bevor Proben gemessen werden können, muss die Säule mit dem Eluenten bei gleicher Flussrate und Temperatur der anzuwendenden Methode gespült werden (siehe auch Eluent). Die Säule ist equilibriert, wenn die Basislinie des Detektors keine Drift mehr aufweist (i. d. R. nach 10 Säulenvolumina).

Säulenaufbewahrung

Die Säule wird mit 5 mmol/L H₂SO₄ ausgeliefert. Auch für die Aufbewahrung wird dieser Eluent empfohlen. Stellen Sie bitte sicher, dass die Verschlusschrauben fest schließen, da ansonsten das Packungsmaterial austrocknen kann. Sollte die Säule austrocknen, so zeigt sich unter den normalen Arbeitsbedingungen ein erhöhter Rückdruck. In diesem Fall spülen Sie die Säule mit 5 mmol/L H₂SO₄ bei 90 °C und einer Flussrate von 0,3 mL/min. Steigern Sie die Flussrate langsam auf 0,5 mL/min und achten darauf, dass der maximale Druck nicht überschritten wird.

Anwendungsbeispiele

Verschiedene Anwendungsbeispiele finden Sie unter www.mn-net.com/apps. Wählen Sie hier Ihre NUCLEOGEL® Phase mit „Search criteria: Phase“ im Pull-Down-Menü unter „Search word“ aus.

Behebung möglicher Fehler

Das folgende Schema beschreibt typische Symptome eines Leistungsverlustes und deren Ursache. Alle Säulen unterliegen den strengen Richtlinien und Kontrollen unserer Qualitätssicherung. Polymersäulen halten bei korrekter Pflege und Behandlung ihre Trennleistung über lange Zeiträume aufrecht. Erfahrungsgemäß sind Säulenausfälle meist auf eine Verunreinigung des Sorbensbettes oder auf eine Verwendung falscher, ungeeigneter Lösemittel zurückzuführen. Verwendung einer Vorsäule sowie sachgerechte Probenvorbereitung und Anwendung der Säule verhindern meist diese Probleme.

Benutzen Sie folgendes Schema, um die Ursache eines möglichen Leistungsabfalls zu ermitteln:

Symptom / Fehler / Ursache	Vorbeugung / Behebung
Basislinien-Drift · nicht ausreichende Zeit zur Gleichgewichtseinstellung mit dem Eluenten · verunreinigter Eluent · Temperatur	längeres bzw. besseres Equilibrieren frische Lösemittel und Reagenzien verwenden Säulenthmostatierung
Breite Peaks · Mischung und/oder Diffusion vor/hinter der Säule · zu großes Probenvolumen	Länge und ID der Kapillaren möglichst klein halten geringes Injektionsvolumen
Peaküberlagerung; zu schnelle Elution zu schnelle Elution und/oder unzureichende Trennung durch: · nicht angemessene Säulentemperatur oder Eluentenflussrate · Anwesenheit von Metallkationen im Eluenten (z. B. Na ⁺ oder Ca ²⁺)	entsprechenden Parameter optimieren Eluenten frei von Metallkationen verwenden
Steigender Rückdruck; Verschlechterung der Trennung Verunreinigung des Sorbens durch: · Ansammlung von Partikeln auf der Fritte oder im Sorbensbett aus der Probe, dem Eluenten oder dem System · Ansammlung von eiweißartigem Material durch Bakterienwachstum in Probe oder im Eluenten	Eluenten frisch zubereiten, Proben und Eluenten vorher filtrieren / LC-System spülen, reinigen des Sorbens (s. Säulenregenerierung) Probe gekühlt lagern, Eluenten frisch zubereiten / reinigen des Sorbens (s. Säulenregenerierung)
Unzureichende Trennung; Verschlechterung der Trennung bei normalem Säulendruck Verunreinigung mit: · Metallionen aus LC-System oder Probe · Fette, Öle, Lipide aus der Probe (Belegung der Sorbensoberfläche) und andere organische Substanzen aus unsachgemäß aufbereiteten Eluenten und Matrices	PEEK-Kapillaren, Metallionen aus Probe entfernen / Säule regenerieren (s. Säulenregenerierung) organische Substanzen durch Probenvorbereitung entfernen / reinigen des Sorbens (s. Säulenregenerierung)
Doppelpeaks (Totvolumen): · fehlerhafte Verschraubungen (Kapillaren, Ferrules, Schrauben) · Kompression des Säulenbettes durch zu hohe Flussraten und durch Verwendung eines nicht empfohlenen organischen Modifiers	Verwendung von „PEEK Fingertight Fittings“, REF 718770 / Austausch der Verschraubungen max. Flussrate und zulässigen Eluenten beachten / entspannen des Polymerbettes (s. Säulenregenerierung)

Säulenregenerierung

In einigen Fällen kann die Trennleistung der Säule wiederhergestellt werden, indem man die Verunreinigungen vom Sorbensbett entfernt oder das Polymerbett entspannt. Allerdings ist es wichtig, die Ursache zu lokalisieren, bevor die Säule wieder für die Analyse von Proben verwendet wird.

- Frischen Eluenten zubereiten:** In einigen Fällen wird der Leistungsabfall durch eine Verunreinigung des Eluenten verursacht. Verwenden Sie deshalb stets frischen Eluenten und spülen Sie alle Flüssigkeitsleitungen, bevor Sie die Säule weiter benutzen. Der Eluent sollte vor Gebrauch durch eine 0,2–0,45 µm Membran filtriert und entgast werden.
- Reinigen des Sorbens:** Stellen Sie die Säulentemperatur auf 65 °C, und pumpen über Nacht ein Gemisch von Wasser mit max. 30% Acetonitril mit 0,1 mL/min durch die (umgedrehte) Säule. Der Druck sollte 70 bzw. 150 bar nicht übersteigen. Unter Umständen kann ein dunkel gefärbtes Eluat, das aus der Säule kommt, am Kapillaren beobachtet werden. Am nächsten Tag ersetzen Sie das Gemisch Acetonitril – Wasser wieder durch 5 mmol/L H₂SO₄, und pumpen zunächst mit 0,1 mL/min, um festzustellen, ob der Druck nachgelassen hat. Wenn der Druck niedriger ist, erwärmen Sie die Säule wieder auf 90 °C und erhöhen die Flussrate nach und nach auf 0,4 mL/min. Testen Sie die Säule unter normalen Arbeitsbedingungen. Wenn der Druck wieder normal ist, aber die Trennleistung schlecht bleibt, versuchen Sie die Säule zu regenerieren.
- Säulenregenerierung:** Bereiten Sie eine 25 mmol/L H₂SO₄ Lösung und pumpen diese für mindestens 2 h (mitunter über Nacht) bei 85 °C mit 0,3 mL/min durch die (umgedrehte) Säule. Stellen Sie die Flussrate so ein, daß der maximale Druck nicht überschritten wird. Dann betreiben Sie die Säule wieder in der üblichen Art und Weise. Eine anfangs minimal driftende Basislinie sollte sich im Equilibrierungsschritt stabilisieren. Wird eine starke Drift beobachtet, so equilibrieren Sie die Säule bei 85 °C mit entgaster 5 mmol/L H₂SO₄ Lösung bis die Basislinie stabil ist.
- Entspannen des Polymerbettes:** Die Polymere bestehen aus kompressiblen kugelförmigen Partikeln. Durch einen Rückdruck von mehr als 70 bzw. 150 bar werden die Partikel deformiert. Dies führt zu einer Verdichtung des Säulenbettes und zu einem weiteren Druckanstieg. Um das Säulenbett wieder zu dekomprimieren schalten Sie die Pumpe ab, und lassen das Polymer etwa 30 min „entspannen“. Drehen Sie die Säule um, und pumpen den Eluenten über Nacht mit einer Flussrate von 0,1 mL/min bei 90 °C durch die Säule. Dann kehren Sie zu den normalen Arbeitsbedingungen für die Säule zurück.
- Säulenaustausch:** Die hier beschriebenen Vorschläge können die Trennleistung der Säule leider nicht in allen Fällen wieder herstellen. Wir empfehlen dringend, die Ursache des Problems zu ermitteln, bevor Sie eine neue Säule einsetzen.

1 Säulenvolumen (300 mm Länge x 7,8 mm ID Säule) ≈ 14 mL

Zusammenfassung

Um die Lebensdauer der Säule zu verlängern, berücksichtigen Sie bitte folgende Hinweise:

- Der empfohlene Eluent ist verdünnte Schwefelsäure in Konzentrationen von 0,5–25 mmol/L. Die Eluenten sollten durch eine 0,2–0,45 µm Membran filtriert und entgast werden.
- Filtrieren Sie die Proben vor der Injektion mit einem 0,2–0,45 µm CHROMAFIL® Xtra PET Spritzenvorsatzfilter.
- Verwenden Sie bei verschmutzten Proben eine Vorsäule.
- Die empfohlene Flussrate beträgt 0,1–0,7 mL/min.
- Stellen Sie die Flussrate so ein, dass der Säulendruck von 70 bar (SUGAR 810 H) bzw. 150 bar (ION 300 OA) nicht überschritten wird.
- Wenn die Säule längere Zeit nicht benutzt wird, lagern Sie sie equilibriert mit einer 5 mmol/L H₂SO₄ Lösung.
- Benutzen Sie für alle Arbeiten Reagenzien mindestens von p. A. Qualität und Lösungsmittel in HPLC-Qualität. Verwerfen Sie alle Lösungen, die Anzeichen von Bakterienwachstum zeigen.

Informieren Sie sich über alle MACHEREY-NAGEL Chromatographie-Produkte: www.mn-net.com/chromatographie



... für applikative Hilfestellungen besuchen Sie unsere Applikationsdatenbank mit mehr als 3000 Chromatographie-Applikationen: ChromaAppDB.mn-net.com



NUCLEOGEL® SUGAR 810 H ION 300 OA

Note: All HPLC columns from MACHEREY-NAGEL are supplied with a certificate, which contains specifications and test results of the column.
The columns NUCLEOGEL® SUGAR 810 H and NUCLEOGEL® ION 300 OA are quality products based on a polymer that requires special care. Introduction of organic solvents into the column except as described below will cause the polymer to swell resulting in column overpressure. Consequently, prior to column installation, you should familiarize yourself with the contents of this manual. The columns are specifically developed for chromatographic high performance analysis. If carefully and properly used excellent chromatographic results and long column lifetime can be achieved. Depending on modification these products can be used for separation and for a quantitative determination of sugars, sugar alcohols, alcohols and organic acids. All HPLC separation columns must exclusively be used in accordance with universally accepted laboratory regulations and working methods of high performance liquid chromatography. Before running the column the entire analytical system (column and equipment) must be carefully checked by the operator. Chromatographic conditions (mobile phase, flow, temperature etc.) have to be adapted to the analytical task. MACHEREY-NAGEL does not give any warranty and is not liable for the success of a separation or application. If you have any questions after reading this manual, please call our service / technical support.

Table of contents

- Safety indication
- Description of the column
- Installation
- Guard columns
- Sample
- Eluent
- Flow rate and pressure
- Temperature
- Detection
- Equilibration
- Column storage
- Application notes
- Troubleshooting
- Column regeneration
- Abstract

Safety indication

Follow the general safety instructions for handling of HPLC solvents used as mobile phases (e.g., diluted sulfuric acid) and take precautions against any kind of injuries or damage to health (e.g., skin and eye protection in case of broken capillaries). Disposal of used HPLC columns must follow international, national and local environmental protection regulations. The use of HPLC columns is only permitted to staff members, who are qualified in their field. Keep HPLC columns away from children. MACHEREY-NAGEL disclaims and excludes all warranties of any kind or nature whatsoever and MN shall not be liable for any damages (whether direct, indirect, foreseeable, incidental, compensatory, consequential or special), whether based upon warranty, contract, tort or strict liability, if damages and/or losses occur caused by improper use, maintenance, neglect or improper treatment (especially opening of the column and exposure of the column bed).

Description of the column

As stationary phase NUCLEOGEL® SUGAR 810 H and NUCLEOGEL® ION 300 OA columns contains a sulfonated, spherical polystyrene/divinylbenzene polymer matrix (PS/DVB) in H⁺ form. The polymeric phase SUGAR 810 H is specifically designed for the separation of numerous polar organic compounds like organic acids, alcohols, sugar alcohols and sugars; NUCLEOGEL® ION 300 OA is especially suited for the separation of organic acids, alcohols and sugars from wine, juice, further food and biological samples. The separation of the analytes is based on a combination of different mechanisms. Ion exclusion and ion exchange effects dominate, due to the charge of the sulfonic acid groups. Hydrophobic interactions and steric exclusion due to the polystyrene skeleton are possible.

Installation

The column should be installed in the flow direction indicated on the column label. It is connected with 1/16" capillaries and fittings, typical for HPLC instruments. They should be as short as possible to avoid dead volume.

Guard columns

For protection and an extension of column lifetime the column should always be used with a guard column. The filter elements and the adsorbent in the guard column retain contaminants from the sample or the eluent. Connection of the guard column with the separation column is made by a suitable guard column holder (see www.mn-net.com or the MN chromatography catalog). Cartridge replacement is required when increased column pressure and/or loss of performance is observed.

Sample

The usually aqueous sample should be passed through a syringe filter (e.g., CHROMAFIL® Xtra PET, 0.45 µm, 25 mm, REF 729220) before entering the column. If injected sample solutions are still turbid even after filtration, the lifetime of the column may be significantly reduced. Avoid introduction of fats, oils, proteinaceous materials and particulates into the column. These substances will ultimately cause an increase in operating pressure and may be difficult or impossible to remove. Furthermore, certain samples found in the food industry may contain organic matter that is soluble in the food sample, but not in the eluent. Build-up of these compounds can lead to a plugging and a column overpressure. Only in a few cases a regeneration (see column regeneration) can recreate the primary column efficiency. Impurities like salts and proteins change the retention behavior of the column. Hence, they must be removed from the samples before injection by an adequate sample preparation (e.g., protein precipitation). Numerous methods of sample purification can be found in the literature. Also a sample preparation by solid phase extraction with the SPE columns CHROMABOND® for example is usable for a removal of interfering compounds and matrix components.

The maximum injection volume, which can be applied on the column, must be empirically determined for a particular sample. Generally smaller sample volumes cause higher separation efficiencies. If the injection volume is too large, peaks can broaden or merge with nearby peaks. Thus, we recommend sample volumes in the 10 to 50 µL range.

Eluent

Diluted sulfuric acid with a concentration of 0.5–25 mmol/L is used as eluent, filtered with a 0.2–0.45 µm membrane and degassed prior to use. Further acids such as phosphoric acid, perchloric acid and nitric acid can be used; but halide-containing acids (e.g., hydrochloric acid) are not recommendable due to their corrosive effect on stainless steel. Up to 30 vol% acetonitrile can be added as organic modifier for SUGAR 810 H. For changing to eluents containing acetonitrile, the column is first flushed with a 5% acetonitrile mixture at 0.1 mL/min (at least 3 h). Then it can be equilibrated with a higher content of acetonitrile. The eluents should always be prepared with demineralized water and analytical grade reagents, free of metal ions. Eluents with other cations than H⁺ will damage the column.

Flow rate and pressure

It is good practice to limit flow rates such that the pressure does not exceed 70 bar (SUGAR 810 H) or 150 bar (ION 300 OA). Typical flow rates are between 0.1 and maximum 0.7 mL/min. Changes of the flow rate should be performed in small steps. We recommend controlling back pressure regularly. If a high pressure results from the use of the column at nominal flow rates, this usually indicates that some contaminants have become deposited on the packing material, which must be removed (see troubleshooting).

Temperature

Optimum temperatures for successful separations of sugars should be determined empirically. The temperature range is between 20 and 90 °C. To obtain reproducible results, a column heating device is also recommendable for ambient temperature. In general, higher column temperatures result in reduced sample retention, higher separation efficiency, and lower column pressure. Particularly for low temperature, the flow rate should be adjusted such that the maximum pressure will not be exceeded.

Detection

Refractometric detectors are preferentially used with these columns. But spectrophotometers, mass spectrometers and electrochemical detectors can also be used. If electrochemical detectors are used, please note that high temperatures may be incompatible with some working electrodes. If a higher sensitivity is required, post-column derivatizations with an appropriate detector for the reaction product can be used.

Equilibration

Prior to measurement of samples the column must be rinsed with the eluent at the same flow rate and temperature as the method to be applied. Column equilibration is finished, when the baseline of the detector no longer shows a drift (generally after 10 column volumes).

Column storage

The column is supplied with 5 mmol/L H₂SO₄. This is also the recommended eluent for storage. When the column is stored, be sure the end fittings are tightly sealed using column end plugs, because storage without these seals can result in drying of the packing material. If the column should be dried up, it results an increased back pressure under the general working conditions. Under these circumstances rinse the column with 5 mmol/L H₂SO₄ at 90 °C with a flow rate of 0.3 mL/min. Gradually increase flow rate to 0.5 mL/min and observe that the maximum pressure will not be exceeded.

Application notes

Diverse application notes can be found under www.mn-net.com/apps. Select here your NUCLEOGEL® phase with "Search criteria: Phase" in the pull-down menu of "Search word".

Troubleshooting

The following outline describes the symptoms of performance loss and their cause. All columns are subject to the strict regulation and control of our quality assurance system. Polymer columns hold their separation efficiency for long periods by correct maintenance and treatment. According to experience, column failures are mostly a result of injection of contaminants to the sorbent bed or usage of wrong, improper solvents. The usage of a guard column, as well as an appropriate sample pretreatment and application of the column will help to minimize these risks.

Use the outline below to help determine the cause of a possible performance loss:

Symptom / Error / Cause	Prevention / Remedy
Baseline drift · insufficient period for equilibration with the eluent · contaminated eluent · temperature	longer or better equilibration use freshly prepared solvents and reagents column temperature control
Broad peaks · mixing and/or diffusion before/behind the column · too large sample volume	keep length and ID of capillaries at a minimum smaller injection volume
Peak interference; too fast elution too fast elution and/or insufficient separation by: · improper column temperature or flow rate · presence of cations in the eluent (e.g., Na ⁺ or Ca ²⁺)	optimize concerned parameter use eluent free of metal cations
Increasing back pressure; degradation of the separation performance contamination of sorbent by: · particulate accumulation on frit or sorbent bed from sample, eluent or system · accumulation of proteinaceous material from microbial growth in sample or in eluent	prepare fresh eluent, prefilter samples and eluent / rinse LC system, clean the sorbent (see column regeneration) keep sample cool, prepare fresh eluent / clean the sorbent (see column regeneration)
Insufficient separation; degradation of the separation with regular column pressure contamination with: · metal ion from LC system or sample · fats, oils, lipids from sample (coating of polymer surface) and other organic substances from improperly prepared eluent or matrices	PEEK capillaries, remove metal ion from sample / regenerate column (see column regeneration) remove organic substances by sample preparation / clean the sorbent (see column regeneration)
Double peaks (dead volume) · faulty fittings (capillaries, ferrules, nuts) · compression of column bed by too high flow rates and by usage of an improper organic modifier	use "PEEK Fingertight Fittings", REF 718770 / replace fittings consider maximum flow rate and allowed eluent / expand the polymer bed (see column regeneration)

Column regeneration

In some cases the performance of the column can be restored by removing contaminants from the sorbent bed or by decompression of the polymer bed. It is important, however, to locate the source of contamination before again using the column for the analysis of samples.

- Prepare fresh eluent:** In some cases the performance loss is traced to eluent contamination. Therefore, prepare fresh eluent and flush all liquid lines before using the column again. The eluent should be filtered through a 0.2–0.45 µm membrane and degassed prior to use.
- Cleaning of sorbent:** Set column temperature at 65 °C and pump a solution of water with max. 30% acetonitrile with 0.1 mL/min through (inverted) column overnight. The pressure must not exceed 70 or 150 bar. Under circumstances a dark-colored eluate coming from the column can be observed at the column end. The next day, replace the mixture acetonitrile – water by 5 mmol/L H₂SO₄ and continue pumping with 0.1 mL/min to determine if pressure has subsided. If pressure is lower, return column temperature to 90 °C and gradually increase eluent flow rate to 0.4 mL/min. Test the column under normal operating conditions. If the pressure has returned to normal status, but the performance remains inadequate, attempt to regenerate the column.
- Column regeneration:** Prepare a 25 mmol/L H₂SO₄ solution and pump it through the (inverted) column for minimum 2 h (under circumstances over night) with 0.3 mL/min and 85 °C. Adjust the flow rate to keep pressure below the maximum pressure. Then operate the column in normal fashion. An initial minimal baseline drift should be rapidly stabilized by the equilibration step. If excessive drift is observed, operate column at 85 °C with degassed 5 mmol/L H₂SO₄ until the baseline stabilizes.
- Decompression of polymer bed:** The polymer consists of compressible spherical particles. The particles are deformed by a back pressure above 70 or 150 bar, resp. Thus, a compression of the column bed and a further increase of pressure results. To decompress the column bed, shut off the pump and allow the polymer to "relax" for about 30 min. Invert the column and pump the eluent through the column with 0.1 mL/min at 90 °C overnight. Then return the column to normal operating conditions.
- Column replacement:** The above procedures will restore performance only in certain cases. Under circumstances, column replacement is necessary. It is highly advisable to locate the cause of the problem before installing a new column.

1 column volume (300 mm length x 7.8 mm ID column) Δ 14 mL

Abstract

To extend column lifetime, please keep in mind the following:

- The recommended eluent is diluted sulfuric acid with concentration of 0.5–25 mmol/L. Eluents should be filtered through a 0.2–0.45 µm membrane and degassed.
- Filter samples through a 0.2–0.45 µm CHROMAFIL® Xtra PET syringe filter before injection.
- Use a guard column for contaminated samples.
- The recommended flow rate is 0.1–0.7 mL/min.
- Adjust flow rate to keep column pressure below the maximum value of 70 bar (SUGAR 810 H) or 150 bar (ION 300 OA).
- When the column is not to be used for extended periods, store equilibrated in 5 mmol/L H₂SO₄ solution.
- Use analytical grade reagents and HPLC grade solvents for all work. Discard any solutions that show evidence of bacterial growth.

Please check the full range of MACHEREY-NAGEL chromatography products: www.mn-net.com/chromatography

... for applicative support please visit our application database with more than 3000 chromatography applications: ChromaAppDB.mn-net.com